

PCT/EP 98/05127  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EPO - DG 1

02. 12. 1998

REC'D	10 DEC 1998
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

Herr Professor Dr.Dr. Wilhelm S t o f f e l in Köln/  
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Menschliche und murine (Maus) neutrale  
Sphingomyelinase (nSMase) und deren re-  
kombinante Überexpression in prokaryoti-  
schen und eukaryotischen Zellen"

am 11. August 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf die Memorec Stoffel GmbH in Köln/  
Deutschland umgeschrieben worden.


Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 12 N, C 12 Q und G 01 N der Internationalen Patent-  
klassifikation erhalten.

München, den 25. August 1998

**Der Präsident des Deutschen Patentamts**

Im Auftrag

 **Brand**

Aktenzeichen: 197 34 764.9

11.08.98



Belegexemplat  
des Patents des Erfinders

**Patentanmeldung beim Deutschen Patentamt**

**München**

**Zweibrückenstraße 12**

**80331 München**

**Tel. 089-2195-0**

**Fax 089-2195-2221**

EPO - DG 1

02.12.1998

**Anmelder: Professor Dr.Dr.Wilhelm Stoffel**

Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften

Institut für Biochemie, Med. Fak.

Joseph-Stelzmann-Strasse 52

50931 Köln

Telefon: 0221-478-6881

Fax: 0221-478-6882

e-mail: wilhelm.stoffel@rs1.rz.uni-koeln.de

### **Titel:**

**Menschliche und murine (Maus) neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und deren rekombinante Überexpression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen**

**Anwendungsgebiet:** Die Erfindung betrifft die komputerunterstützte Erfindung der humanen und murinen cDNA (komplementären DNA) und ihre Expression in pro- und eukaryotischen Zellen und deren Überexpression in bakteriellen Zellen und Säuger-Zelllinien. nSMase ist ein Enzym, das Plasmamembran ständiges Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet. Ceramid ist ein wichtiger second messenger in der Signaltransduktion, die zum programmierten Zelltod oder zu Zellwachstum und Differenzierung der Zelle führen. Die nSMase cDNA dient als wichtiges Werkzeug bei der Aufklärung der Mechanismen in diesen zellulären Prozessen: *in vitro* z.B. über enzymatische Essays bei der Erfindung und Charakterisierung von Inhibitoren und Aktivatoren (Medikamenten). In *in vivo* Systemen dient sie der Herstellung nSMase exprimierender pro- und eukaryotische Zelllinien und transgener und knock out Maus Modelle.

Durch die Erfindung konnte

1. das Enzym molekular charakterisiert werden
2. kann die Regulation der zellulären Signaltransduktionschritte, die vom second messenger Ceramid abhängig sind, z.B. Zellapoptose (programmierter Zelltod), Entzündungen Zellproliferation, analysiert werden, eine Voraussetzung für

3. die Entwicklung von pharmakologischen Leitstrukturen, die die Zielstruktur nSMase aktivieren und oder hemmen.

Die nSMase cDNA dient ferner der Isolierung des Menschen und Mausgens. Letzteres ist die Grundlage für die Erstellung eines nSMase Defizienz-Mausmodells durch gene targeting zur Erforschung menschlicher Krankheiten.

**Stand der Technik:** Es werden die saure und neutrale Sphingomyelinase von Säugern unterschieden

1. Enzyme können auf rein biochemischen Weg gereinigt und charakterisiert werden. Alle bisherigen Versuche zur Isolierung der nSMase sind gescheitert.
2. Durch Computer unterstützte Recherchen in bestehenden und der sich im Rahmen des Genom Projektes ständig erweiternden Datenbanken, z.B. EST-Libraries, werden DNA und Protein Sequenzen von undefinierter Information auf Motive untersucht, die die Zielstruktur für ihre Funktion tragen sollte: die cDNA Sequenz einer potentiellen Zielstruktur wird hierzu in pro- und/oder eukaryotischen Zellen transkribiert und translatiert und das Genprodukt auf die zu erwartende Funktion(en), z.B. enzymatische Aktivität, Rezeptor-, Transporteraktivitäten untersucht.

Der letztgenannte computer unterstützte und biochemisch-molekularbiologische Charakterisierungsweg führte zur Erfindung der menschlichen und murinen nSMase, deren Aktivität, nicht aber ihre Struktur bekannt war.

**Nachteile des Standes der Technik:** Viele Proteine widerstehen allen Versuchen, mit den gängigen Techniken in reiner Form zu ihrer Charakterisierung und funktionellen Analyse dargestellt zu werden. Dies gilt besonders in vorliegenden Fall für die nSMase.

Konventionell gereinigte Proteine können vor allem nicht Mutationen analysiert werden, nicht überexprimiert, ihre Mutationen nicht auf ihre Bedeutung für menschliche Erkrankungen, allgemein nicht in ihrer Bedeutung für die Zelle erfaßt werden.

Die nSMase wird in jeder Zelle expremiert, besonders aber im Gehirn.

Da seine Aktivierung über Zellrezeptoren wie Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Fas Liganden und andere Zytokine erfolgen kann, nimmt es eine Schlüsselstellung in den

Signaltransduktionsketten der Zelle ein, die zum programmierten Zelltod (Apoptose) wie bei vielen Differenzierungsvorgängen und bei entzündlichen sowie Tumor Erkrankungen oder zum Zellwachstum und anderen von NF  $\kappa$  B, ein von TNF  $\alpha$  induzierter Transkriptionsfaktor, gesteuerten Genexpressionen. Bisher sind molekulare Untersuchungen der nSMase Funktion für die Generierung von als second messenger für Signaltransduktionsketten der Säugerzelle und menschlichen Erkrankungen unmöglich gewesen. damit aber die Analyse der Regulation der nSMase Aktivität, und die Entwicklung und Prüfung von Inhibitoren und Aktivatoren (Pharmaka) in ihrer Wirkung auf das Enzym und seine Folgereaktionen.

Ferner erlaubt die Erfindung die Suche nach durch nSMase - Mutationen bedingte genetische Erkrankungen.

**Aufgabe der Erfindung:** Die Bedeutung und Aufgabe der Erfindung besteht in

- a) der Expression des nSMase-cDNA in Säugerkellen, um ihre Funktion bei zellulären Prozessen, wie Apoptose, Zellproliferation und die Regulation von Zielstrukturen verstehen zu lernen. Weiterhin soll nach bisher noch nicht bekannten unter der Regulation der durch nSMase induzierten Ceramid abhängigen Signaltransduktionschritte gesucht werden.
- b) Es sollen Zelllinien, die nSmase konstitutiv überexprimieren, als Screening Systeme für die Entwicklung und Prüfung von pharmakologischen Leitstrukturen entwickelt werden.
- c) die nSMase cDNA dient der Isolierung des menschlichen und murinen (Maus) Gens, ersteres zur Bestimmung des Genlocus und zur Suche von menschlichen nSMase gekoppelten Erkrankungen, letzteres zur Erstellung einer nSMase "knock out" Mauslinie zum Studium menschlicher Erkrankungen und als mögliches Model für gentherapeutische Anwendungen.

**Lösung der Aufgabe:** Die Lösung erfolgt wie im Anwendungsgebiet des Anspruchs I beschrieben.

**Vorteile der Erfindung:** Die Vorteile der Erfindung bestehen

- a) in der Aufklärung der molekularen Struktur der nSMase auf der DNA und Proteinebene.
- b) in der Herstellung von nSMase überexprimierenden Säugerkelllinien für das Screening von Aktivatoren und / oder Inhibitoren, die in der Signaltransduktion über das in der nSMase

gebildete Ceramid bei pathologischen Zuständen (Apoptose, Entzündung, Immunreaktionen) eingreifen.

- d) in der Erstellung eines nSmase defizienten Mausmodells, das defekte nSmase Allele enthält (knock out Maus). Dieses Mausmodell wird zur systematischen Analyse von bisher unbekannten *nsmase* Gendefektes sowie für in vivo Anwendungen in Art der präklinischen Studie von Pharmaka, eingesetzt, die durch Screening in den vorgenannten Zelllinie erkannt wurden.

Das null-allelische Mausmodell dient ferner der Entwicklung gentherapeutischer Strategien dienen.

#### Ansprüche:

1. cDNA Sequenzen, die murine und menschliche nSmase kodieren, ein Enzym, das Ceramid und Phosphocholin bildet. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß es als enzymatisches Produkt Ceramid, einen Lipid second messenger bildet, der Signaltransduktionswege reguliert.
2. Die durch Effektoren (Cytokine, Vitamin D3, Tumornekrose Faktor  $\alpha$ , Fas u.a. induzierte nSmase setzt Ceramid frei, das die Signaltransduktionswege aus Anspruch 1 aktiviert. Diese können
  - a) den programmierten Zelltod (Apoptose) normaler und maligner Zellen und
  - b) Zellwachstum und Differenzierung regulieren.
3. cDNA Sequenzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in pro- und eukaryotischen Zellen transient und stabil (permanent) exprimiert werden kann.
4. Die in Anspruch 3 genannten Zelllinien dienen dem Screening und der Charakterisierung von chemischen Substanzen, die als Inhibitoren und/oder Aktivatoren (Medikamente) wirken.
5. cDNA Sequenzen, die murine und menschliche nSmase kodieren, nach Anspruch 1 zur Isolierung des menschlichen und murinen (Maus) nSmase Gens verwendet werden können.
6. Gen-Sequenzen, die murine und menschliche nSmase kodieren, nach Anspruch 4, zur Aufklärung von menschlichen Krankheiten verwendet werden können.
7. cDNA Sequenzen, die murine und menschliche nSmase kodieren, nach Anspruch 1, für die Herstellung rekombinanter nSmase in pro- und eukaryotischen Zellen verwendet werden können.

8. Vom murinen Gen ausgehend ein nSMase "knock out" modell als Basis für präklinische Studien etabliert werden kann.